



ESTG



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA FLORA MICROBIANA DO QUEIJO DA
SERRA DA ESTRELA COMO MARCADOR DE AUTENTICIDADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA FLORA MICROBIANA DO QUEIJO DA SERRA DA ESTRELA COMO MARCADOR DE AUTENTICIDADE

Nelson Miguel Fernandes Couto

2019

Escola Superior de Tecnologia e Gestão



**INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO**

Nelson Miguel Fernandes Couto

Avaliação do potencial da flora microbiana do queijo da Serra da Estrela como marcador de autenticidade

Mestrado em Engenharia Alimentar

**Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Joana Maria Gomes dos Santos**

**e sob a co-orientação da
Professora Doutora Maria Manuela de Lemos Vaz Velho**

Novembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de usar esta secção para transmitir os meus agradecimentos a todas as pessoas que me ajudaram e contribuíram na realização desta dissertação ao longo deste ano.

Principalmente, a minha coorientadora a Professora Doutora Manuela Vaz Velho, por me sugerir e facilitar a participação no projeto MOBFOOD para realizar esta dissertação.

À minha orientadora a Professora Doutora Joana Santos, pela ajuda, informação, orientação e apoio que me deu durante a realização e finalização desta dissertação e também pela sua disponibilidade.

Queria também agradecer à Eng. Carla Ramos por toda a ajuda prestada na realização deste trabalho tanto na parte prática como na parte teórica.

Gostaria também de agradecer ao Doutor Rui Rocha, bolseiro do projeto MOBFOOD, por toda a ajuda que me deu ao longo deste trabalho e pela sua disponibilidade para esclarecer as dúvidas que foram surgindo durante este trabalho.

Não poderia deixar por agradecer a ajuda prestada no laboratório pela Luísa Imperadeiro e ao Vitor Monteiro.

E finalmente agradecer a todos os meus amigos que me apoiaram e ajudaram durante a realização desta dissertação e também agradecer todo o apoio que a minha família me deu.

RESUMO

Nos últimos anos a qualidade e a autenticidade tem sido uma das exigências dos consumidores perante os produtos alimentares, tendo os consumidores aumentado a procura de produtos com qualidade, não só em termos de questões associadas à segurança alimentar, mas também à rastreabilidade e autenticidade, principalmente devido às fraudes existentes no setor alimentar.

Este trabalho enquadrou-se no projeto MOBFOOD, tendo como principal objetivo caracterizar a composição microbiana do queijo da Serra da Estrela DOP para avaliar o seu potencial como possível marcador de autenticidade deste queijo da Serra da Estrela DOP.

Para a realização deste trabalho e para se cumprir o objetivo principal foram recolhidas amostras de leite, cardo, coalhada e queijos fornecidas pelo produtor da Serra da Estrela em janeiro, março e junho de 2019. A caracterização do microbioma das amostras foi efetuada através da utilização de meios de cultura seletivos e diferenciais seguida de testes de confirmação (catalase, oxidase e Gram), com posterior identificação das colónias selecionadas através de técnicas de biologia molecular.

Embora não existam critérios microbiológicos regulamentados em termos de análises microbiológicas relativas à qualidade das amostras do leite, cardo e coalhada fez-se a comparação com as guidelines da Health Protection Agency A título meramente indicativo. Apenas uma amostra de leite foi considerada satisfatória, relativamente ao cardo apenas uma se considerou aceitável sendo que para a coalhada existiram cinco aceitáveis. Relativamente ao queijo consideramos um pronto a comer e usando os mesmos critérios todas as amostras analisadas obtiveram um resultado não satisfatório. Em relação aos resultados às bactérias do ácido láctico os resultados obtidos foram semelhantes aos reportados por outros estudos que analisaram a composição microbiana do queijo da Serra da Estrela DOP. Também foi possível observar que a flora de bactérias lácticas se manteve

constantes ao longo das amostragens não tendo sido afetada pelos diferentes tipos de cardo nem por diferentes momentos de produção.

Este facto representa assim um possível indicador da possibilidade de se usar a flora de bactérias do ácido láctico do queijo da Serra da Estrela DOP como um marcador de autenticidade e rastreabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: queijo da Serra da Estrela DOP; qualidade; autenticidade; análises microbiológicas; bacterias lácticas.

ABSTRACT

In recent years quality and authenticity has been one of consumers demands for food products, with consumers increasing the search for quality products, not only in terms of issues associated with food safety, but traceability and authenticity, mainly due to the frauds present in the food sector.

This work was part of the MOBFOOD project, with the main objective of characterizing the microbial composition of the Serra da Estrela cheese (PDO) to evaluate its potential as a possible marker of authenticity of the Serra da Estrela cheese (PDO).

Samples of milk, thistle, curd and cheese were provided by a producer of Serra da Estrela region were collected in January, March and June 2019. The characterization of the endogenous flora of the samples was performed through the use of selective and differential culture media followed by confirmation tests (catalase, oxidase and Gram), with subsequent identification of the selected colonies through molecular biology techniques.

In terms of microbiological analyses relating to the quality of samples in milk only one sample was considered satisfactory, in relation to thistle only one considered acceptable and that for the curd there were five acceptable and in relation to cheese all samples analyzed obtained an unsatisfactory result. Regarding the results of lactic acid bacteria the results obtained were similar to the results reported by other studies I analyzed the microbial composition of the Serra da Estrela cheese (PDO). It was also possible to observe that the flora of lactic acid bacteria remained constant throughout the samples and was not affected by different types of thistle nor by different moments of production.

This represents a possible indicator of the possibility of using the flora of lactic acid bacteria of the cheese of the Serra da Estrela cheese (PDO) as a marker of authenticity and traceability.

KEYWORDS: Serra da Estrela cheese (PDO); quality and authenticity; microbiological analyses; lactic acid bacteria

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
lista de abreviaturas	x
Enquadramento.....	1
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fraudes alimentares.....	3
1.1.1 Carnes	6
1.1.2 Azeite virgem	6
1.1.3 Pescado	7
1.1.4 Vinho.....	7
1.1.5 Vinagre	8
1.1.6 Produtos lácteos	8
1.2 Metodologias analíticas para a deteção da fraude alimentar	9
1.2.1 Cromatografia	10
1.2.2 Espectrometria de massa.....	10
1.2.3 Espectroscopia de infravermelho	11
1.2.4 Análises genéticas	11
1.2.5 Microbiologia	13
1.3 Indicações geográficas -IGs	15
1.4 Queijo Serra da estrela DOP.....	16
1.5 Objetivos	18

2	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	Plano de amostragem.....	19
2.2	Preparação da amostra	21
2.2.1	Leite, Coalhada e Queijo	21
2.2.2	Cardo	21
2.3	Análises.....	22
2.4	Testes de classificação fenotípica	24
2.4.1	Catalase:	24
2.4.2	Oxidase:	24
2.4.3	Coloração de Gram:	24
2.4.4	Preparação da amostra:	24
2.4.5	Teste de coloração Gram:	25
2.5	Preparação para análise do ADN	26
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4	CONCLUSÃO	55
5	BIBLIOGRAFIA	56
6	APÊNDICES	65
6.1	Apêndice I – Lista de meios e reagentes	65
6.2	Apêndice II – Lista de equipamentos	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Selo DOP	16
Figura 2-Selo DOP e Holograma da Casa da Moeda	17

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de fraudes detetadas e reportadas nos boletins da JRC nos últimos dois anos em alguns produtos alimentares	4
Tabela 2-Plano de amostragem	19
Tabela 3-Análises da qualidade microbiológica	22
Tabela 4-Análises Bactérias LAB.....	23
Tabela 5-Qualidade microbiológica do Leite	29
Tabela 6-Bactérias do ácido láctico no leite	30
Tabela 7-Qualidade microbiológica do cardo	33
Tabela 8-Bactérias do ácido láctico no cardo.....	34
Tabela 9-Qualidade microbiológica na coalhada.....	36
Tabela 10- Bactérias do ácido láctico na coalhada	37
Tabela 11-Qualidade microbiológica do queijo.....	40
Tabela 12- Bactérias do ácido láctico do queijo	41
Tabela 13 - Identificação por sequenciação das colónias	44
Tabela 14 -Lista de meios e reagentes	65
Tabela 15 - Lista de equipamentos	68

LISTA DE ABREVIATURAS

µL - microlitro

°C- Graus célsios

ADN - Ácido desoxirribonucleico

Bp- Pares de bases

DGADR- Direcção-Geral De Agricultura e Desenvolvimento Rural

DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis

DOP – Denominação de origem protegida

ETG - Especialidade tradicional garantida

GC – Cromatografia de gasosa

IGP - Indicação Geográfica Protegida

JRC - Joint Research Centre

LAB - Bactérias do ácido láctico

LC – Cromatografia de líquidos

MC – Cromatografia de massa

MIR - Mid-Infrared

Min – minutos

ml - mililitro

NGS – Next-Generation Sequencing

NIR - Near-infrared spectroscopy

NMR - Nuclear magnetic resonance

PCR - Polymerase chain reaction

Rpm – rotação por minuto

UE – União Europeia

ENQUADRAMENTO

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do projeto de um projeto de investigação e desenvolvimento tecnológico, dividido em Produtos, Processos, Serviços (PPS): PPS2-Resíduos e Utilização Eficiente de Recursos; PPS3-Embalagens Sustentáveis com propriedades ativas para aplicações alimentares; PPS4-Nutrição, Saúde e Bem-Estar; PPS5-Qualidade e Segurança Alimentar; PPS6-Autenticidade e Rastreabilidade de produtos frutícolas DOP e IGP e queijo DOP; PPS7-Logística - Cadeia Logística Agroalimentar Sustentável Colaborativa e PPS8-Consumidor - Novas Tecnologias de Avaliação, tendo estas sido atribuídas a diferentes parceiros. Esta dissertação enquadrada no PPS6 incidiu na autenticidade e rastreabilidade do queijo da Serra da Estrela DOP mas simultaneamente desenvolveu-se o trabalho de avaliação da qualidade microbiológica ao longo do processo.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos quinze anos a qualidade e a autenticidade dos produtos alimentares ganhou relevância junto dos consumidores que procuram produtos com qualidade, não só em termos de questões associadas à segurança alimentar, mas também à rastreabilidade e autenticidade. Esta atitude por parte dos consumidores, para além de imposições legais, impôs novas regras no sector alimentar devido ao grande impacto económico que as decisões dos consumidores tem dentro do setor (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica, & Georgiou, 2016; Sentandreu & Sentandreu, 2014).

Um produto alimentar é autêntico se a sua descrição comercial está de acordo com a composição e as características do produto e podem ser certificados através da rotulagem e métodos analíticos objetivos. Dada esta necessidade o custo de produção dos produtos aumenta devido aos testes de autenticidade acarretam custos extras.

As questões associadas à autenticidade são inúmeras e estão relacionadas com a substituição ou adição de ingredientes deliberadamente pelo produtor, pelo uso de alegações erróneas nomeadamente espécies animais ou vegetais, ou mesmo até a raça utilizada, a região de origem, a tecnologia envolvida e qualquer adição de ingredientes não rotulados no produto alimentar. Na maioria dos casos, os problemas relacionados com a autenticidade não estão associados a questões de saúde pública, mas à fraude deliberada e à intenção de vender um produto inferior como autêntico. A força por trás de qualquer adulteração é maximizar os lucros usando um ingrediente mais barato substituindo-o, total ou parcialmente, na esperança que o produto adulterado passe despercebido ao consumidor final. Nos últimos anos, os casos de fraude no sector alimentar começaram a aumentar e têm mais notoriedade a nível público, ocorrendo em vários produtos alimentares, nomeadamente carnes, peixes, bebidas, produtos lácteos entre outros. As fraudes mais típicas estão presentes em produtos à base de carne ou peixe na substituição das espécies utilizadas para a produção (Prado, Boix, & von Holst, 2013; Premanandh, 2013).

Assim, existem muitas questões associadas às fraudes na autenticidade alimentar como: enganar o consumidor, competição desleal com indústrias que operam com legitimidade e alteração da perceção do consumidor perante um produto.

Embora a legislação tenha vindo a tornar-se mais exigente, deixando pouca margem para operações fraudulentas no processamento de géneros alimentícios, existem pressões sobre a necessidade de legislação quanto à proteção do consumidor e à proteção dos produtores. Não existe na União Europeia (UE) uma definição harmonizada para “fraude alimentar”. Contudo, a inexistência desta definição não significa que a UE e os países europeus não ajam de forma coordenada contra as práticas de adulteração na cadeia alimentar. Respondendo às preocupações dos consumidores a 13 de março de 2018, a Comissão Europeia lançou o “Knowledge Centre for Food Fraud and Quality” sob a alçada do Joint Research Centre (JRC). Este centro fornece e partilha conhecimentos científicos atualizados sobre questões de fraude e qualidade alimentar bem como coordena

as atividades de fiscalização do mercado e opera um sistema de aviso prévio e informações sobre fraude alimentar. Tem como objetivos:

1. Criar uma interface formal de ciência / política em apoio a iniciativas para salvaguardar a qualidade dos produtos agroalimentares e proteger a integridade da cadeia alimentar;
2. Garantir a partilha de conhecimentos entre os diferentes departamentos da Comissão, cientistas e autoridades competentes nos países da UE através de uma comunidade de práticas;
3. Estabelecer colaboração com autoridades de países terceiros.

Este centro complementa as atividades da Rede da UE de fraudes alimentares “EU Food Fraud Network”.

1.1 FRAUDES ALIMENTARES

Desde 2016 a JRC “Food Fraud” compila mensalmente as fraudes reportadas no setor alimentar em todo o mundo (Tabela 1). Estas fraudes são divididas em várias categorias tais como a substituição, a rotulagem incorreta, a origem incorreta e a contrafação. Estas fraudes estendem-se a uma ampla gama de produtos alimentares e geralmente não são um risco para a saúde do consumidor. Na maioria das vezes as fraudes têm razões económicas, aumentando a margem de lucro, reduzindo a qualidade do produto e fornecendo assim um produto de inferior qualidade ao que o consumidor espera obter (Miri A., 2018).

Entende-se por substituição quando um produtor/vendedor produz/vende um produto, com características parecidas com o produto original, mas na realidade é um produto de inferior qualidade e custo. Em relação à rotulagem incorreta isto acontece quando o produtor indica no rótulo de um produto algo que não está presente e adiciona ao produto algo que não está na rotulagem levando a que o consumidor acredite que está a adquirir um produto com as características que ele procura (Premanandh, 2013).

A indicação errada da região de origem ocorre quando um produtor/vendedor indica um produto como sendo de uma determinada origem, o que dá um valor acrescentado ao produto, quando na realidade o produto não está dentro das

características para se poder designar como produto da região rotulada, esta alteração cria a oportunidade de se aproveitar de um consumidor que procura produtos com denominação de origem. Deste modo conseguem colocar preços mais elevados nos seus produtos quando o seu fabrico foi mais barato que os produtos originais (Cawthorn, Steinman, & Witthuhn, 2012).

A diluição acontece em produtos líquidos e a fraude consiste na adição de alguma substância de maneira a diminuir a quantidade de matéria-prima usada, por exemplo a adição de água ao leite, esta fraude permite que o produtor com a mesma quantidade de matéria-prima consiga produzir uma maior quantidade de produto final, sendo esse produto de baixa qualidade e não mantendo as suas características típicas (Yang et al., 2019).

O melhoramento artificial consiste na adição de substâncias, normalmente químicos, a um produto que normalmente não necessita ou não pode ter a sua adição, para enriquecer as características de um produto inferior e comercializá-lo como se fosse um produto de qualidade superior, enganando o consumidor e quebrando as regras de produção de alguns produtos (Geana et al., 2016).

Tabela 1 - Resumo de fraudes detetadas e reportadas nos boletins da JRC nos últimos dois anos em alguns produtos alimentares

Alimento	País	Fraude	Data
Carne	Reino Unido	Substituição	05/10/18
	Espanha	Rotulagem incorreta	10/07/18
	Espanha	Indicação errada da região de origem	08/02/18
	Reino Unido	Rotulagem incorreta	02/10/18
	Malta	Indicação errada da região de origem	14/01/19

Peixe	Itália	Rotulagem incorreta	10/08/18
	USA	Indicação errada da região de origem	13/06/18
	Espanha	Rotulagem incorreta	14/06/18
	Itália	Rotulagem incorreta	23/04/18
	Reino Unido	Substituição	01/02/19
Azeite	Portugal	Rotulagem incorreta	16/08/18
	Brasil	Diluição	01/05/18
	Itália	Substituição	25/10/18
	Turquia	Indicação errada da região de origem	15/01/19
	Itália	Substituição/ Rotulagem incorreta	12/04/19
Vinho	França	Melhoramento artificial	01/04/18
	Portugal	Rotulagem incorreta	06/03/18
	Itália	Substituição	11/10/18
	Itália	Substituição/Rotulagem incorreta	31/01/19
	Itália	Melhoramento artificial	12/02/19
Leite	India	Melhoramento artificial	18/04/18
	Argentina	Rotulagem incorreta	14/03/19
Vinagre	Itália	Substituição	06/02/18

	Itália	Substituição	09/03/19
Queijo	Itália	Contrabando	28/10/18
	Itália	Substituição	06/06/18
	Espanha	Rotulagem incorreta	29/10/18
	Brasil	Rotulagem incorreta	19/03/19
	Reino Unido	Substituição	17/04/19

1.1.1 CARNES

No que diz respeito a produtos à base de carne nos últimos anos surgiram vários casos que levantaram um alerta para a substituição de carne de bovinos por carne de cavalo, sendo este o caso que mais se destacou, os produtos que foram adulterados com carne de cavalo ou mesmo completamente substituídos sem o consumidor do produto saber. A deteção desta fraude levou a que as autoridades aumentassem os procedimentos de autenticação dos alimentos como também à implementação de novas técnicas para a deteção de possíveis adulterações no produto. As fraudes em relação à autenticidade dos produtos cárnicos dividem-se em quatro categorias: o disfarce de origem; a adição de aditivos; tratamentos aplicados ao produto e a substituição que pode ser substituição de carne como de gordura ou mesmo de proteínas. Estes podem ser detetados com as várias técnicas que são usadas na atualidade passando por análises de Ácido desoxirribonucleico, cromatografia e espectrofotometria (Ballin, 2010; Premanandh, 2013; Sentandreu & Sentandreu, 2014; El Sheikha et al., 2017).

1.1.2 AZEITE VIRGEM

Na produção de comércio de azeite virgem existem e foram reportados vários tipos de fraude nos quais se destaca a substituição, por produtos de inferior qualidade e características, a diluição com produtos derivados de outras plantas e frutos nomeadamente a soja, girassol, colza e milho, onde durante a produção se

efetua a mistura com azeites, usando uma quantidade muito pequena de azeite virgem. Estas situações criam um grande problema no setor que prejudica o consumidor e os produtores que não realizam fraude. Estas situações de adulteração e de substituição são detetadas através de análises que as autoridades realizam para manter o controlo do produto e do setor. As fraudes podem detetar-se por cromatografia, espectrofotometria e com o recurso à posterior análise estatística através de técnicas de quimiometria (Christy, Kasemsumran, Du, & Ozaki, 2004; Danezis et al., 2016; Torreblanca-Zanca et al., 2019; Zou et al., 2009).

1.1.3 PESCADEO

O setor das pescas também se vê afetado por vários casos de fraude que passam pela indicação da origem incorreta, rotulagem incorreta e substituição. Isto causa um grave problema aos consumidores no ato da compra. Estas fraudes dão-se quando o produtor oculta a verdadeira origem do produto, coloca informação enganosa no rótulo ou faz a substituição da espécie que supostamente está a vender por uma similar, mas de qualidade e preço inferior. Para combater estas fraudes e garantir a autenticidade do produto para proteger o consumidor aplicam-se técnicas mais avançadas de controlo nomeadamente através da sequenciação do ADN. Esta técnica consegue detetar se o produto analisado foi alvo de manipulação com o intuito de fraude (Cawthorn et al., 2012; Woolfe & Primrose, 2004; Xiong et al., 2018).

1.1.4 VINHO

O setor vinícola praticamente desde o início, tem sido sujeito a várias práticas fraudulentas, tendo estas práticas ao longo dos tempos vindo a evoluir. No início estas passavam por uma simples diluição chegando na atualidade ao uso de melhoramentos artificiais. Para além disso, também ocorrem situações em que se aplica uma rotulagem inadequada ao produto, estas situações acabam sempre por prejudicar o consumidor que no ato da compra está a adquirir um produto que não corresponde ao que esperava devido às adulterações realizadas ao mesmo. Devido ao crescimento do número de casos de atividade fraudulenta neste setor começaram-se a realizar análises para combater os mesmos onde se aplicam

técnicas cromatográficas e isotópicas para detetar as adulterações realizadas ao produto (Geana et al., 2016; Vicol, Rapeanu, & Bahrim, 2009).

1.1.5 VINAGRE

O vinagre é um produto usado globalmente como condimento há vários anos. Inicialmente este produto era considerado como um produto barato e secundário devido a ser um produto que advém da produção de vinho principalmente, contudo também pode ser produzido através de outros produtos como por exemplo maçãs mas, ultimamente, como tem acontecido por todo o setor alimentar, a procura por produtos com uma qualidade superior tem aumentado, e como em toda a indústria este facto criou a possibilidade da introdução de atividades fraudulentas na produção do vinagre. Estas atividades baseiam-se principalmente na substituição do produto onde o produtor vende um produto diferente ao que anuncia, nomeadamente um que tenha menos custos de produção e características semelhantes ao que o consumidor espera. Para tentar diagnosticar estas atividades realizam-se vários tipos de análises ao produto passando por ressonância magnética (NMR) até a utilização de ADN (Consonni, Cagliani, Rinaldini, & Incerti, 2008; Ríos-Reina et al., 2017; Milanović et al., 2018).

1.1.6 PRODUTOS LÁCTEOS

As fraudes relacionadas com o leite passam por toda a cadeia produtiva até chegar ao consumidor, estas fraudes não afetam só os consumidores finais como também afetam as indústrias que dependem do leite para a produção dos seus produtos. Tipicamente a maioria de situações que levam a alteração do produto ocorre no produtor, onde pode ocorrer a substituição por leite de qualidade inferior, a manipulação e adição de compostos para melhorar o produto, sem efetuar a referência da sua adição, que causa também uma rotulagem deliberadamente incorreta. Esta situação origina um ganho económico por parte do produtor na cadeia produtiva e o prejuízo de todos os elementos restantes da cadeia. Para tentar evitar que isto ocorra são implementadas várias análises ao leite para verificar a sua qualidade e autenticidade passando por sequenciação de ADN, análises microbiológicas, cromatografia e espectrofotometria (Woolfe & Primrose,

2004; Santos, Fernandes, & Bardsley, 2015; Zhang, Huo, Zhu, & Mao, 2015; Abbas et al., 2018; Liu et al., 2018; Yang et al., 2019).

A indústria queijeira é diretamente influenciada pelos produtores de leite pois esta é a matéria prima principal para produção de queijo. A partir do momento que algum leite adulterado entra no processo produtivo o queijo também passa a ser um produto adulterado isto acontece quando o leite é adquirido a terceiros. Existe também a situação de fraude quando o produtor do queijo, nomeadamente um queijo com denominação de origem protegida (DOP) ou indicação geográfica protegida (IGP), usa vários tipos de leite de regiões diferentes misturados em vez do leite definido para esse tipo de queijo ou usa leite de diferentes espécies. Estas situações podem ser detetadas principalmente através de análise microbiológicas e pela sequenciação de ADN (Abbas et al., 2018; Abriouel, Martín-Platero, Maqueda, Valdivia, & Martínez-Bueno, 2008; Feligini et al., 2005; Goncalves et al., 2018; Guerreiro, Fernandes, & Bardsley, 2012; Kamimura, De Filippis, Sant'Ana, & Ercolini, 2019; Santos et al., 2015; Silveti et al., 2017).

1.2 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETEÇÃO DA FRAUDE ALIMENTAR

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a deteção da fraude alimentar é hoje um dos ramos da ciência alimentar com maior desenvolvimento devido à complexidade e globalização da cadeia alimentar (Creydt & Fischer, 2018). São conhecidos vários métodos de deteção da autenticidade, mas na maioria dos casos, os métodos analíticos clássicos são onerosos, laboriosos e requerem frequentemente a manipulação de compostos que podem apresentar toxicidade elevada para o operador e para o meio ambiente. Por outro lado, estas metodologias podem ser morosas, pelo que não garantem os resultados em tempo útil para um processo de fabrico artesanal ou industrial ou deteção de uma adulteração em tempo real (Mobfood, 2019).

Atualmente existem várias técnicas químicas e espectroscópicas que permitem criar perfis específicos de alimentos, sendo que estes métodos tem de ser normalmente apoiadas com quimiometria, usando métodos estatísticos para

apoiar a análise dos resultados obtidos, dando o máximo de informação possível sobre o produto analisado (Danezis et al., 2016).

Dentro de estas técnicas estão presentes as técnicas de biologia molecular e físico-químicas.

1.2.1 CROMATOGRAFIA

É uma técnica que permite efetuar uma separação dos compostos semelhantes presentes em alimentos com uma matriz complexa. Esta técnica é composta por duas fases, uma móvel e uma estacionária, sendo a fase móvel composta pela amostra e os químicos que ajudam na separação dos compostos e a fase estacionária que atua como um filtro para separar os compostos das amostras. No que diz respeito à autenticidade dos alimentos a cromatografia passa por vários desafios, devido à grande quantidade e variedade de compostos que formam um alimento tendo cada composto um conjunto de características específicas. Os métodos cromatográficos conseguem criar um “fingerprint” dos compostos químicos do alimento fazendo com que seja possível diferenciá-lo de outros produtos. Os principais métodos usados são a cromatografia de gás (GC), a de massa (MC) e a de líquidos (LC), que representam o estado físico do produto analisado. O principal uso da cromatografia é em produtos em que as matérias-primas são relativamente baratas. As adulterações são detetadas através da comparação dos resultados com padrões previamente estipulados (Danezis et al., 2016; Karoui & De Baerdemaeker, 2007; Santos et al., 2015).

1.2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A técnica de espectrometria de massa pode ser usada para verificar a autenticidade dos alimentos e pode ser aplicada em conjunto com a cromatografia. Esta técnica consegue identificar e caracterizar molecularmente as amostras com base na sua composição elementar. O princípio prático desta técnica baseia-se na emissão de iões para a amostra, fazendo com que haja uma fragmentação e a consequente deteção dos iões com base na relação de massa/carga (m/z), o registo dessa deteção cria o espectro de massa. Esta técnica tem-se tornado uma ferramenta confiável para verificação da autenticidade de alimentos, conseguindo

detetar características representativas das amostras, tais como a origem geográfica ou colheita (Danezis et al., 2016; Rubert, Zachariasova, & Hajslova, 2015).

1.2.3 ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica amplamente utilizada em várias áreas devido à elevada rapidez e escassa necessidade de manipulação das amostras, esta técnica consiste na medição da absorvância da amostra usando espectroscopia de infravermelho.

Esta técnica funciona no espectro do infravermelho (IR) passando por, perto de infravermelho (NIR) e infravermelho medio (MIR). Durante a análise das amostras, é criado um espectro que representa o alimento conseguindo assim detetar os compostos presentes no mesmo e conseguindo fazer a análise de forma não destrutiva contando com um limite de deteção alto esta técnica pode ser usada em conjunto com análise de dados multivariada. Para além das técnicas com infravermelho também existem as técnicas de fluorescência que também não são destrutivas e em relação as técnicas de IR tem um limite de deteção inferior contando também com custos de aplicação baixos, funcionando através da reação que faz com que o alimento imita fluorescência conseguindo detetar os compostos presentes. Este conjunto de métodos tem sido aplicado para efetuar a análise de autenticidade em vários tipos de alimentos passando por leite, mel, azeite entre outros (Pomeranz & Meloan, 1994; Santos et al., 2015; Sentandreu & Sentandreu, 2014).

1.2.4 ANÁLISES GENÉTICAS

As análises genéticas tem vindo a sofrer uma evolução ao longo do tempo, cada vez mais existindo vários tipos de análises e os seus custos de utilização tem vindo a diminuir, estas técnicas possuem várias vantagens ao nível de identificação relativamente a outro tipo de técnicas, visto que estas possuem independência das variações das condições que possam existir durante o crescimento microbiano. Estas técnicas são precisas na identificação e tem uma ampla gama na identificação podendo estas identificar espécies como chegar à diferenciação de estirpes (Temmerman, Huys, & Swings, 2004).

A maioria destas técnicas baseiam-se no uso do princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a utilização deste método deve-se a que com ele pode-se realizar uma amplificação de um fragmento de ADN da amostra, para tal podem ser desenhados *primers* específicos, podendo realizar a amplificação que permite a posterior identificação a qualquer nível da taxonomia da amostra, tendo que a amplificação resultante da utilização destes *primers* ser analisada usando por exemplo a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Ou então usar um *primer* mais abrangente onde a amplificação resultante segue para um processo de sequenciação para realizar a identificação mais a nível taxonómico (Temmerman et al., 2004). Geralmente na aplicação destas técnicas em amostras que possuem uma flora microbiana rica em bactérias do ácido láctico (LAB), neste caso queijos, os *primers* são desenhados para trabalhar na zona 16S rDNA devido a que todas as bactérias a possuem e tem maior sensibilidade na deteção (Temmerman et al., 2004).

Atualmente existem várias técnicas de sequenciação de ADN, sendo que se usam principalmente duas na atualidade, a sequenciação de Sanger e a sequenciação de próxima geração/sequenciamento paralelo massivo (NGS). A NGS é uma técnica recente de alta produtividade, devido a executar reações de sequenciação em paralelo, apesar de ser uma técnica com alta produtividade o comprimento da cadeia de ADN que cobre durante a sequenciação é menor do que na sequenciação de Sanger, onde a NGS só cobre cerca de 600 pares de base (bp) (Haynes, Jimenez, Pardo, & Helyar, 2019).

Por outro lado a técnica de sequenciação de Sanger, uma técnica criada nos anos 70, tem um espectro mais alargado em relação ao número de bp que cobre na cadeia de ADN trabalhando entre 700 e 1000 bp, isto permite que esta técnica tenha uma maior cobertura de regiões conseguindo assim abranger regiões que o NGS não consegue cobrir (Hagemann, 2015).

A sequenciação de Sanger consegue representar todas as características presentes na amostra desde que a amostra seja homogénea. Esta técnica devido a estar mais desenvolvida que a NGS consegue obter resultados mais completos (Hagemann, 2015).

1.2.5 MICROBIOLOGIA

As análises microbiológicas podem ser aplicadas para a detecção de fraudes, mas podem ser acompanhadas por técnicas de biologia molecular. As análises microbiológicas são usadas principalmente para análises a qualidade a nível microbiológico dos produtos e estudo da flora presente no mesmo.

Esta técnica é usada para a caracterização microbiológica das amostras, onde através de análises recorrendo a meios seletivos se pode criar um perfil da flora microbiana da amostra, podendo-se comparar com amostras genuínas para verificar se existem alterações. Isto, por si só, não é o suficiente e por isso é que se devem aplicar análises de biologia molecular à flora detetada para verificar com certeza absoluta se os microrganismos presentes se enquadram com o perfil microbiano de uma amostra genuína (Li, Li, & Bian, 2016; Silveti et al., 2017).

A aplicação desta técnica no queijo incide principalmente na flora das bactérias do ácido láctico.

O queijo é um produto derivado do leite, para que este seja formado a matéria-prima passa por uma série de alterações e reações bioquímicas, nas quais se encontram a proteólise e a lipólise onde existe a degradação de proteínas e de lipídios, reações que afetam as bactérias do ácido láctico. Estas são afetadas tanto pelas características do ambiente, como pelo procedimento de produção sendo, como pela alimentação dos animais produtores do leite usado, estas condições tais como a matéria-prima dependentes do local de origem do produto, e pela alimentação dos animais (Stanley, 1998; Santos, 2006).

Este produto possui uma flora microbiana muito rica, mas principalmente composta por bactérias do ácido láctico (LAB), sendo esta flora microbiana é a responsável pelas características típicas e intrínsecas do queijo. Durante o processo produtivo a maioria de alterações microbiológicas do produto ocorrem quando as culturas “*starter*” ou a flora endógena começam a morrer e inicia o

crescimento de uma nova flora microbiana. Devido a este acontecimento as LAB são muito importantes no processo fermentativo não só deste produto como de vários outros que passem por uma ação semelhante (Stanley, 1998).

Estas bactérias são caracterizadas geralmente por serem Gram +, não possuírem a capacidade de produzir esporos e terem a forma de cocos ou bacilos. As LAB no setor alimentício dividem-se em vários géneros sendo os de maior importância para o setor os seguintes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Stanley, 1998).

As bactérias são consideradas presumivelmente LAB com base na sua reação Gram positiva, na ausência de catalase e oxidase negativa.

A parede celular das bactérias do ácido láctico possui as características das bactérias Gram positivas pois durante o processo de coloração a sua parede celular absorve o cristal violeta para o citoplasma sendo que com os passos seguintes a parede celular das bactérias do ácido láctico não dissolve com o álcool mas sim desidrata retendo o cristal violeta e dando-lhe a coloração típica de Gram (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

As bactérias do ácido láctico são incapazes de sintetizar grupos de porfirina (ex.: Heme) quando cultivadas em meios de crescimento laboratoriais que carecem de hematina ou compostos relacionados, o que torna as bactérias LAB desprovidas de uma verdadeira catalase adquirindo um resultado negativo durante o teste da catalase (Axelsson, 1998; Engesser & Hammes, 1994).

Relativamente à oxidase as bactérias do ácido láctico são caracterizadas por possuírem oxidase negativa. Esta característica advém do facto das bactérias lácteas não possuírem cadeia respiratória e assim não usarem o oxigénio para produção de energia dando assim um resultado negativo nos testes de oxidase (Sakamoto & Komagata, 1996).

Porém esta técnica apenas permite detetar as presumivelmente LAB. Para se poder obter uma informação mais aprofundada de estes microrganismos temos de recorrer ao auxílio de técnicas de biologia molecular. Estas permitem obter mais

informação sendo mais fácil de interpretar e também são técnicas que reduzem a probabilidade de erro na identificação de estes microrganismos (Stanley, 1998).

1.3 INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS -IGs

Uma Indicação Geográfica é um indicador usado em produtos provenientes de uma região geográfica precisa e que possuem qualidades e características específicas devido à sua origem. Estes produtos estão protegidos na UE e em países em que a UE pode intervir para assegurar a sua proteção.

Estes produtos estão regulamentados pelo Regulamento UE nº 1151/2012 (E.U., 2013), e dividem-se em três categorias:

- Denominação de origem protegida (DOP) – indica que o produto foi produzido, transformado e preparado na região demarcada, atribuindo-lhe características exclusivas da região de produção;
- Indicação geográfica protegida (IGP) – indica que a qualidade e outras características são atribuídas pela sua origem geográfica;
- Especialidade Tradicional Garantida (ETG) – indica que o produto é de uma certa qualidade e que a sua reputação, qualidade são atribuídas a sua origem geográfica. ("Qualifica portugal | qualifica portugal," 2019)

No final de 2018 na UE existiam 3872 IGs ("Qualifica portugal | qualifica portugal," 2019). Atualmente em Portugal existem 143 IGs, sendo que dessas uma é ETG, existem 77 IGP sendo que destas apenas uma delas é queijo, por outro lado produtos portadores da designação DOP são 65 sendo que 10 deles são queijos, encontrando-se entre eles o queijo da Serra da Estrela sendo este um dos mais importantes do país (DGADR, 2019).

Estes produtos alimentares estão ligados à localização geográfica da sua produção tal como à técnica produtiva, à qualidade e origem da matéria-prima. O nome dos produtos contém o nome do local de origem, todo o processo produtivo passando pela recolha da matéria-prima até a produção final tem de ser efetuado dentro do território que dá nome ao produto, esta metodologia de produção é o que determina as características do produto (Brescia, Monfreda, Buccolieri, & Carrino, 2005).

As restrições impostas ao processo produtivo e a origem da matéria-prima do produto causa a subida do seu preço em relação a outros produtos da mesma categoria que não tenham a certificação. O mesmo facto que causa o acréscimo do custo produtivo do produto também é responsável por um aumento significativo na qualidade e segurança do produto, sendo que os consumidores estão dispostos a pagar um pouco mais por um produto quando tem a garantia de qualidade e de segurança do mesmo. Esta tendência dos consumidores preferirem um produto de maior qualidade, porém mais caro, é o que leva a alguns produtores tentar falsificar produtos para obter um benefício económico (Rocchetti et al., 2018; Yang et al., 2019).

Para evitar estes casos e também para manter um controlo sobre estes produtos, foram implementadas várias técnicas de controlo e autentificação dos produtos, devido ao número de casos fraudulentos que tem invadido o mercado e prejudicando tanto os consumidores como os produtores que cumprem as regras. Estes casos fraudulentos passam pela mistura de matérias-primas, a adição de substância químicas para melhorar o produto e falsificação de rótulos (Ganopoulos, Argiriou, & Tsiftaris, 2011; Rocchetti et al., 2018).

1.4 QUEIJO SERRA DA ESTRELA DOP

Os queijos DOP são produzidos usando técnicas tradicionais e a matéria-prima tem origem na região da produção, o processo produtivo é todo ele realizado de forma artesanal, todos os queijos que têm a designação de DOP tem de cumprir o Regulamento (UE) nº 1151/2012 (E.U., 2013).



Figura 1-Selo DOP (DGADR, 2019)

O queijo da Serra da Estrela é um dos queijos mais conhecidos dentro dos que são produzidos em Portugal, devido à sua produção ser totalmente artesanal. A maioria dos produtores são empresas familiares que já produziam este tipo de queijo mesmo antes de ter recebido a designação DOP e as suas técnicas produtivas tem passado de geração em geração.

Este queijo é caracterizado por ser um queijo curado, de pasta semimole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada, com poucos ou nenhuns olhos, obtido por esgotamento lento da coalhada.

Todos os queijos Serra da Estrela DOP tem de ser produzidos utilizam leite cru proveniente da raça autóctone ovelhas presentes na região sendo elas as ovelhas da raça autóctone bordaleira da serra da estrela, este leite durante o processo produtivo não sofre a adição de culturas “*starter*”, a coagulação deste queijo é realizada através da adição de flor de cardo (*Cynara cardunculus*, L.), sendo primeiro efetuada uma extração da flor do cardo através de água e posteriormente a extração aquosa proveniente do cardo é que é adicionada ao leite. Todos estes fatores contribuem para as suas características organoléticas únicas, tendo-lhe sido atribuída a designação DOP nos anos 90 (Tavaria & Malcata, 1998).

Inicialmente a responsabilidade da certificação e controlo foi atribuída a Federação das Associações de Produtores de Queijo Serra da Estrela (FAPROSERRA) através da aplicação da Portaria nº 10/91 (Ministério da Agricultura.,1991), tendo sido posteriormente esta responsabilidade revogada pelo Decreto Regulamentar nº 38/2002 (Ministério da Agricultura, 2002), passando então o queijo da Serra da Estrela DOP a ser regulamentado pelas normas europeias (E.U., 2012).



Figura 2-Selo DOP e Holograma da Casa da Moeda (DGADR, 2019; DOP-Vale da Estrela.2019)

Atualmente os queijos da serra possuem selos distintivos, um outorgado pela UE para produtos de denominação de origem, e um selo holograma outorgado pela casa da moeda onde consta o número de série (DGADR, 2019).

1.5 OBJETIVOS

Este trabalho está enquadrado no num projeto de investigação, com o objetivo de caracterizar o microbioma do queijo da Serra da Estrela DOP para avaliar o seu potencial como possível marcador de autenticidade do queijo da Serra da Estrela DOP, para além disso avaliou-se a qualidade microbiológica dos vários constituintes envolvidos na produção e do próprio queijo.

O queijo da Serra da Estrela DOP é produzido com leite cru das ovelhas da raça autóctone bordaleira da serra da estrela com adição de cardo. Vários fatores podem contribuir para a especificidade da flora microbiana presente no leite, no cardo e no queijo, tais como a alimentação do animal ou a origem geográfica. As análises microbiológicas realizadas neste trabalho visam cumprir com quatro objetivos específicos:

1-Avaliar a qualidade microbiológica do leite, cardo e queijos, confrontando os parâmetros analisados com a legislação em vigor.

2-Estudar a flora microbiana do leite, cardo e queijo.

3-Relacionar a flora detetada no leite e cardo com a flora detetada no produto final.

4-Avaliar o potencial da flora microbiana como indicador de origem e marcador de autenticidade/adulteração.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e meios utilizados durante a realização deste trabalho encontram-se presentes no apêndice I e II.

2.1 PLANO DE AMOSTRAGEM

Foram recolhidas as seguintes amostras de um produtor.

- Leite de ovelhas da raça autóctone bordaleira da serra da estrela, o leite usado na produção do queijo da serra da estrela DOP;
- Cardo, tendo sido usados 3 cardos distintos sendo eles o cardo do produtor, e outros dois cardos diferentes designados por 5MA e 6M fornecidos ao produtor pela Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV), parceiro do projeto;
- Coalhada, proveniente dos diferentes tipos de cardo;
- Queijo da serra da estrela DOP, proveniente dos diferentes cardos.

As amostras foram divididas por três momentos de amostragem representados na Tabela 2:

Tabela 2-Plano de amostragem

Amostragem	Amostras	Receção
1	Cardo Produtor	12/2018
	Leite	
	Coalhada (Cardo Produtor)	
	Coalhada (5MA)	
	Coalhada (6M)	
	Queijo (Cardo Produtor)	01/2019

	Queijo (5MA)	
	Queijo (6M)	
2	Cardo Produtor	02/2019
	Leite	
	Coalhada (Cardo Produtor)	
	Coalhada (1M)	
	Coalhada (6M)	
	Queijo (Cardo Produtor)	03/2019
	Queijo (1M)	
	Queijo (6M)	
3	Cardo Produtor	04/2019
	Leite	
	Coalhada (Cardo Produtor)	
	Coalhada (5MA)	
	Coalhada (6M)	
	Queijo (Cardo Produtor)	05/2019
	Queijo (5MA)	
	Queijo (6M)	

As matérias-primas nomeadamente o leite, cardo e a coalhada foram recolhidos no início da produção e os queijos foram recolhidos 38 dias após a produção (período de maturação ao qual os queijos tem de ser sujeitos).

2.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

2.2.1 LEITE, COALHADA E QUEIJO

Pesou-se 25 g de amostra para um saco com filtro. De seguida adicionou-se água peptonada (APT) até a suspensão alcançar os 250 g e de seguida colocou-se o saco num *Stomacher* para efetuar a homogeneização.

Após a homogeneização das amostras foram feitas diluições decimais utilizando peptona sal (PS).

2.2.2 CARDO

Pesou-se de 5 a 10 g de amostra para um saco com filtro de seguida adicionou-se APT juntamente com 0.01% Tween 80 até formar uma suspensão de 1/10, de seguida levou-se o saco a um processo de sonicação durante 30 segundo seguido de uma agitação orbital durante 30 min a 150 rpm para homogeneizar a amostra.

Após a homogeneização das amostras foram feitas diluições decimais utilizando peptona sal (PS).

2.3 ANÁLISES

De seguida iniciou-se as análises da qualidade microbiológica das amostras estando estas referidas na Tabela 3 bem como a metodologia usada.

Tabela 3-Análises da qualidade microbiológica

Análise	Método (ISO)
Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	7932:2004
Contagem de <i>E.coli</i>	16649-2:2001
Contagem de Microrganismos a 30°C	4833-1:2013
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	21528-2:2017
Contagem de Bolores e Leveduras	21527-1:2008
Contagem de Estafilococos coagulase positiva	6888-1:1999
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	6579-1:2017
Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	11290-2:2017

Em paralelo realizou-se também a caracterização microbiológica das LAB nas amostras, onde de cada diluição se realizou a inoculação de 0.1 ml de suspensão por espalhamento, realizando estas análises em duplicado e efetuando a sua incubação segundo o que está presente na Tabela 4.

Tabela 4-Análises Bactérias LAB

Meio	Incubação t/T	Grupo de microrganismos alvo	Fonte
AN (aerobiose)	5 dias/10°C	Microflora psicrófila	(Santos, 2006)
M 17 agar (anaerobiose)	2 dias /30°C	<i>Streptococcus</i> spp.	(Dahl, Tavarina, & Xavier Malcata, 2000)
MRS agar (aerobiose)	2 dias /30°C	Mesófilos LAB	(Santos, 2006)
MRS agar (anaerobiose)	2 dias /30°C	Mesófilos anaeróbios LAB	(Santos, 2006)
RA (anaerobiose)	2 dias /30°C	<i>Lactobacillus</i> spp.	(Dahl et al., 2000)
MSE (anaerobiose)	3 dias / 30°C	<i>Leuconostoc</i> spp.	(Dahl et al., 2000)
SBA (aerobiose)	2 dias / 37°C	<i>Enterococcus</i> spp.	(Santos, 2006)

Após o período de incubação das placas, foi efetuada a contagem das colônias presentes nos diferentes meios, e foi tomada em consideração a morfologia das colônias, fazendo assim uma diferenciação por tipo morfológico. De cada tipo de colônias foram isoladas três colônias, dos meios De Man Rogosa Sharpe agar aerobiose (MRSa), MRSa em anaerobiose, M17, Nutriente agar (AN), Rogosa agar (RA) e Agar Mayeux (MSE). As colônias foram de seguida repicadas para o respetivo meio e voltaram a ser incubados nas condições originais para a realização de testes posteriores. Os isolados provenientes do meio Slantz & Bartley agar (SBA) foram repicados para Bile Aesculin Azide Agar (AAB) para efetuar a confirmação, onde o AAB foi a incubar durante 2h a 44,5°C, verificando se os repicados se mantinham inalterados ou se ficavam pretos sendo os últimos considerados oxidase AAB positiva.

2.4 TESTES DE CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Após o término do período de incubação dos isolados foram realizados os testes de catalase e oxidase em cada um deles e de seguida prepararam-se os isolados para efetuar a coloração de Gram.

2.4.1 CATALASE:

O teste da catalase foi realizado em todos os repicados onde de cada repicado se retirou uma pequena porção e se colocou em reação com água oxigenada (H_2O_2) esperando uns segundos para verificar se ocorre reação ou não. É considerado uma reação de catalase positiva quando a reação liberta bolhas de gás da H_2O_2 e é considerado uma reação negativa quando em contacto com a H_2O_2 o repicado se mantém inerte não produzindo qualquer efeito. O resultado esperado é de catalase negativa quando a amostra não faz reação com H_2O_2 .

2.4.2 OXIDASE:

O teste da oxidase realizou-se em paralelo com o teste da catalase onde se colocou uma porção do repicado numa tira de oxidase para verificar a existência de reação. Se a tira não mudasse de cor a reação era considerada de oxidase negativa e se ocorre alteração na cor considerava-se que o repicado tinha oxidase positiva. O resultado esperado para este teste é oxidase negativa.

Após os testes selecionou-se os isolados que possuíam catalase e oxidase negativa para avançar para o teste de coloração Gram.

2.4.3 COLORAÇÃO DE GRAM:

Para a realização da coloração de Gram inicialmente preparou-se as soluções de coloração, sendo elas o álcool a 95%, lugol, cristal de violeta e saframina.

2.4.4 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

Para cada repicado aplicou-se uma gota de água numa lamela, de seguida aplica-se um pedaço do repicado na gota e espalhasse o mesmo na gota. Para terminar a preparação deixa-se secar a lamela ao ar ou então para agilizar o

processo de secagem pode-se passar a lamela levemente pela chama do bico de bunsen, com cuidado para não danificar a amostra.

2.4.5 TESTE DE COLORAÇÃO GRAM:

O teste de coloração Gram divide-se por várias etapas onde se aplicam as soluções na amostra preparada, para que os microrganismos presentes na amostras ganhem coloração e seja possível a sua visualização com o auxílio do microscópio para detetar se eram Gram +(azul/violeta) ou – (vermelha) e se possuíam a forma de bastonetes ou cocos.

Estas etapas para a realização do teste foram as seguintes:

1. Colocou-se o cristal violeta na lamela com a amostra e deixou-se repousar durante 60s;
2. Lavou-se a lamela com dH₂O;
3. Colocou-se o lugol durante 60s;
4. Voltou-se lavar a lamela com dH₂O;
5. Lavou-se com álcool a 95% até a coloração violeta sair;
6. Voltou-se lavar a lamela com dH₂O;
7. Colocou-se a saframina na lamela e deixou-se repousar durante 30s;
8. Lavou-se por última vez com dH₂O;
9. Deixou-se secar a lamela;
10. Depois de seca colocou-se a lamela num microscópio para a análise.

Após a realização das colorações necessárias coloca-se a lamela num microscópio para efetuar a verificação, tanto da cor como da forma do microrganismo em questão onde os resultados são expressos em Gram + ou Gram -, dependendo se apresenta cor azulada/violeta ou vermelha, respetivamente e a sua forma pode ser apresentada como cocos quando a sua forma se assemelha a um círculo e como bastonete quando a sua forma é cilíndrica, contudo as bactérias que neste caso revelam interesse são as Gram + pois isto trata-se de uma das características das LAB (Mossel, Corry , Struijk, Baird, 1995).

2.5 PREPARAÇÃO PARA ANÁLISE DO ADN

Para realizar a sequenciação do ADN dos isolados selecionados e posterior identificação das estirpes, o processo dividiu-se em três etapas. Primeiro realizou-se a extração do ADN dos isolados, depois efetuou-se a amplificação por PCR e finalmente efetuou-se o envio das amplificações para a empresa Eurofins Genomics para a realização da sequenciação via sequenciação de Sanger.

Para a extração do ADN realizaram-se as seguintes etapas:

1. Repicou-se as colónias selecionadas para MRSA e realizou-se a sua incubação de 2 dias a 30°C.
2. Após a incubação retirou-se uma porção de cada colónia individualmente e colocou-se a porção em 50 µL de solução de extração (Solução de liticase – 50 unidades/mL² em tampão TE – 10 mM Tris e 1 mM EDTA) em um tubo eppendorf.
3. Levou-se o tubo ao vórtex.
4. De seguida colocou-se a incubar 1 hora a 37°C e posteriormente 10 minutos a 98°C.
5. Voltou-se a levar o tubo ao vórtex.
6. Centrifugou-se durante 3 minutos a 10 000 rpm.
7. Colocou-se cada extração em gelo até se usar para amplificação.

Para a realização da amplificação por PCR efetuou-se o seguinte:

1. Adicionou-se o 5 ng ADN extraído a 50 µL de reação (master mix BioRad Itaq), juntamente com os *primers* 27f (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) e 1492r (5´ TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3´) estando dentro das regiões v1, v2 e v3.
2. Iniciou-se o processo de amplificação usando os seguintes ciclos: 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C, 60 segundos a 72°C, 10 minutos a 72°C.
3. Enviou-se as amplificações resultantes para a empresa efetuar a sequenciação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos às análises efetuadas em relação à qualidade microbiológica foram comparados com os seguintes documentos: Regulamento N° (UE) 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal e também com as *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market da Health Protection Agency* (HPA)(Bolton et al., 2009).

No que diz respeito aos resultados da qualidade microbiológica das amostras de leite analisadas (Tabela 5), as amostras L-1 e L-2 encontram-se dentro do limite estipulado de $\leq 5.0 \times 10^5$ UFC/ml para microrganismos a 30°C, sendo que é o único parâmetro regulamentado, e a amostra L-3 supera esse limite como se pode observar na Tabela 5. Pode-se verificar também que as contagens relativas aos microrganismos a 30°C coincidem com as contagens das LAB (Tabela 6). Visto que só existia limite para microrganismos a 30°C comparou-se os restantes parâmetros com as guias do HPA a título meramente indicativo.

Nas amostras de leite no que diz respeito ao parâmetro de *Enterobacteriaceae* as amostras L-2 e L-3 estão dentro do limite satisfatório de $< 10^2$ UFC/ml, já a amostra L-1 esta dentro do limite aceitável de 10^2 a $\leq 10^4$ como se pode verificar na Tabela 5.

Relativamente ao parâmetro de *Escherichia coli* nas três amostras não foi detetada sendo um resultado satisfatório visto que o limite para se poder considerar satisfatório é $< 10^2$ UFC/ml (Tabela 5).

Em relação ao parâmetro de *Bacillus cereus* as três amostras estão dentro do limite satisfatório de $< 10^3$ UFC/ml como se pode ver na Tabela 5.

Para o parâmetro de Estafilococos coagulase positiva o limite estipulado para ser um resultado satisfatório é de < 20 UFC/ml estando as amostras L-2 e L-3 dentro desse limite. A amostra L-1 está acima do limite máximo de $> 10^4$ UFC/ml sendo assim não satisfatória (Tabela 5).

No parâmetro de *Listeria monocytogenes* não foi detetada em nenhuma amostra estando assim satisfatório (Tabela 5). Relativamente ao parâmetro *Listeria* spp. a amostra L-1 está acima do limite máximo de $>10^2$ UFC/ml estando assim não satisfatória. As amostras L-2 e L-3 estão dentro do limite aceitável de 10 a $\leq 10^2$ como se pode ver na Tabela 5.

Em relação ao parâmetro *Salmonella* spp. as três amostras apresentam resultados satisfatórios pois não foi detetada (Tabela 5).

Dentro dos parâmetros de segurança alimentar para o leite, seguindo os limites de HPA a amostra L-2 pode-se considerar satisfatória devido a todos os parâmetros se encontrarem satisfatórios. As restantes amostras contêm pelo menos um parâmetro não satisfatório, estando assim estas não satisfatórias.

Tabela 5-Qualidade microbiológica do Leite

	L-1	L-2	L-3
Microrganismos	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Microrganismos a 30°C	2.6×10^5	2.0×10^5	9.4×10^6
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.2×10^2	1.4×10^1	6.5×10^1
<i>Escherichia coli</i>	Nd	Nd	Nd
<i>Bacillus cereus</i>	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
Estafilococos coagulase positiva	2.5×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nd	Nd	Nd
<i>Listeria</i> spp.	1.6×10^3	Nd	Nd
Bolores	3.5×10^1	1×10^3	5×10^2
Leveduras	3.7×10^3	2.2×10^3	2.6×10^4
<i>Salmonella</i> spp.	Nd/25ml	Nd/25ml	Nd/25ml

Satisfatório/Aceitável/ Não satisfatório Nd- não detetado

Tabela 6-Bactérias do ácido láctico no leite

	L-1	L-2	L-3
Meio	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Nutriente agar (Microflora psicrófila)	Ne	5.0×10^4	4.1×10^7
MRS agar (Mesófilos LAB)	1.3×10^5	2.2×10^5	2.1×10^6
MRS agar (AN) (Mesófilos anaeróbios LAB)	1.4×10^5	1.9×10^5	1.5×10^6
M 17 agar (<i>Streptococcus</i> spp.)	1.7×10^5	3.0×10^5	2.2×10^6
Rogosa agar (<i>Lactobacillus</i> spp.)	7.0×10^4	2.5×10^5	1.3×10^6
AgarMayeux (<i>Leuconostoc</i> spp.)	6.0×10^4	7.3×10^4	4.3×10^5
Slantz & Bartley agar (<i>Enterococcus</i> spp.)	3.0×10^4	2.5×10^4	5.6×10^5

Ne- não executado

Tanto para as amostras de cardo como de coalhada foram realizadas análises microbiológicas, mas tendo em conta que não existe um limite legal estipulado para estes devido a que não são destinados ao consumo direto, mas sim destinados à produção do queijo, decidiu-se utilizar a guia HPA para realizar a comparação de resultados a título meramente indicativo.

Em relação às amostras de cardo o parâmetro de *Enterobacteriaceae* da amostra P-3 encontra-se dentro do limite aceitável de 10^2 a $\leq 10^4$ UFC/g. As restantes amostras superam o limite máximo de $>10^4$ UFC/g sendo assim não satisfatórias (Tabela 7).

Relativamente ao parâmetro *Escherichia coli* apenas a amostra 6M-1 apresenta crescimento acima do limite máximo de $>10^2$ UFC/g sendo assim não satisfatória. As restantes encontram-se abaixo <20 UFC/g sendo assim satisfatórias (Tabela 7).

Para o parâmetro *Bacillus cereus* todas as amostras estão dentro do limite satisfatório de $<10^3$ UFC/g como se pode ver na Tabela 7 sendo assim um resultado satisfatório.

No parâmetro de Estafilococos coagulase positiva o limite estipulado para ser um resultado satisfatório é de <20 UFC/g sendo que todas as amostras abaixo desse limite as amostras apresentam um resultado satisfatório (Tabela 7).

Em relação ao parâmetro *Listeria monocytogenes* não foi detetada em nenhuma das amostras sendo um resultado satisfatório (Tabela 7).

Relativamente a *Listeria* spp. as amostras 6M-1 e 6M-2 estão acima do limite máximo de $>10^2$ UFC/g estando assim não satisfatórias. As restantes amostras estão satisfatórias devido a sua presença não se ter sido detetada (Tabela 7).

Em relação ao parâmetro *Salmonella* spp. todas as amostras apresentam resultados satisfatórios pois não foi detetado o microrganismo nas amostras (Tabela 7).

Verificando os parâmetros de segurança alimentar para o cardo, seguindo os limites de HPA, apenas a amostra P-3 pode ser considerada como aceitável visto que no parâmetro de *Enterobacteriaceae* está dentro do aceitável. As restantes amostras contêm pelo menos um parâmetro que se encontra não satisfatório sendo assim consideradas não satisfatórias. Estes resultados sugerem a necessidade acrescida de no processo subsequente as condições de processamento implementadas serem eficazes na eliminação destes potenciais perigos para o produto final.

Tabela 7-Qualidade microbiológica do cardo

	6M-1	5MA	P-1	P-2	6M-2	1M	P-3
Microrganismos	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Microrganismos a 30°C	3.0×10^5	2.5×10^5	3.0×10^5	6.6×10^5	3.0×10^6	5.1×10^5	9.0×10^4
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.5×10^5	1.7×10^4	1.5×10^5	1.7×10^5	1.5×10^6	3.8×10^4	2.1×10^3
<i>Escherichia coli</i>	3.2×10^2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	1.5×10^1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
<i>Bacillus cereus</i>	$<1.0 \times 10^1$	1.1×10^1	4.0×10^1	1.7×10^2	2.7×10^1	1.5×10^1	$<1.0 \times 10^1$
Estafilococos coagulase positiva	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Listeria spp.</i>	4.5×10^2	Nd	Nd	Nd	1.8×10^2	Nd	Nd
Bolores	7.3×10^4	3.3×10^3	3.5×10^3	1.3×10^4	3.8×10^4	4.2×10^5	4.4×10^3
Leveduras	4.6×10^5	4.7×10^4	5.7×10^4	6.8×10^3	4.5×10^3	2.0×10^4	2.8×10^3
<i>Salmonella spp.</i>	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g

Satisfatório/Aceitável/ Não satisfatório Nd- não detetado

Tabela 8-Bactérias do ácido láctico no cardo

	6M-1	5MA	P-1	P-2	6M-2	1M	P-3
Microrganismos	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Nutriente agar (Microflora psicrófila)	3.0×10^6	2.6×10^5	5.9×10^5	1.2×10^6	8.5×10^6	5.4×10^5	6.4×10^5
MRS agar (Mesófilos LAB)	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	7.6×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	1.3×10^3
MRS agar (AN) (Mesófilos anaeróbios LAB)	4.5×10^2	$<1.0 \times 10^2$	2.7×10^3	1.9×10^4	9.7×10^4	1.2×10^4	4.5×10^2
M 17 agar (<i>Streptococcus</i> spp.)	1.1×10^5	9.1×10^2	3.2×10^4	5.9×10^5	2.6×10^5	2.8×10^4	1.5×10^5
Rogosa agar (<i>Lactobacillus</i> spp.)	$<1 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	3.6×10^3	2.4×10^3	1.5×10^5	$<1 \times 10^0$	9.1×10^2
AgarMayeux (<i>Leuconostoc</i> spp.)	4.0×10^4	1.1×10^3	4.0×10^4	3.4×10^3	1.3×10^5	$<1 \times 10^2$	3.5×10^3
Slantz & Bartley agar (<i>Enterococcus</i> spp.)	3.0×10^3	$<1.0 \times 10^2$	1.3×10^4	1.1×10^4	2.7×10^4	$<1 \times 10^2$	5.5×10^3

Tal como nas amostras anteriores o paralelismo com os critérios do HPA, para a colahada, só podem ser encarados em termos indicativos.

No que toca às amostras de coalhada no parâmetro de *Enterobacteriaceae* todas as amostras encontram-se dentro do limite aceitável de 10^2 a $\leq 10^4$ UFC/g (Tabela 9).

Relativamente ao parâmetro *Escherichia coli* as amostras 6M-1 e P-1 apresentam crescimento acima do limite aceitável de 20 a $\leq 10^2$ UFC/g. Tendo as restantes amostras um crescimento dentro do limite satisfatório de < 20 UFC/g (Tabela 9).

Para o parâmetro *Bacillus cereus* todas as amostras estão dentro do limite satisfatório de $< 10^3$ UFC/g como se pode ver na Tabela 9 sendo assim um resultado satisfatório.

No parâmetro de *Estafilococos* coagulase positiva as amostras P-3, 6M-3 e 5MA-2 estão dentro do limite aceitável de 20 a $\leq 10^4$ UFC/g sendo que as restantes amostras estão acima do limite máximo de $> 10^4$ UFC/g estando assim não satisfatórias.

No parâmetro de *Listeria monocytogenes* não foi detetada em nenhuma das amostras sendo um resultado satisfatório (Tabela 9).

Relativamente ao parâmetro *Listeria* spp. a amostra P-2 está satisfatória, as amostras 1M, P-3, 6M-3 e 5MA-2 estão dentro do limite aceitável de 10 a $\leq 10^2$. As restantes amostras encontram-se acima do limite máximo de $> 10^2$ UFC/g estando assim não satisfatórias.

Em relação ao parâmetro *Salmonella* spp. todas as amostras apresentam resultados satisfatórios pois não foi detetada (Tabela 9).

Tabela 9-Qualidade microbiológica na coalhada

	6M-1	5MA-1	P-1	P-2	6M-2	1M	P-3	6M-3	5MA-2
Microrganismos	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Microrganismos a 30°C	2.5x10 ⁶	2.1x10 ⁶	7.6x10 ⁵	1.7x10 ⁶	7.1x10 ⁶	2.3x10 ⁷	8.8x10 ⁵	6.5x10 ⁵	6.9x10 ⁵
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.4x10 ³	6.9x10 ²	6.3x10 ²	6.5x10 ²	5.0x10 ³	<1.0x10 ²	2.6x10 ²	2.2x10 ²	3.9x10 ²
<i>Escherichia coli</i>	3.6x10 ¹	5.0x10 ⁰	2.3x10 ¹	5.0x10 ⁰	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	1.8x10 ¹
<i>Bacillus cereus</i>	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
Estafilococos coagulase positiva	1.5x10 ⁵	1.5x10 ⁵	5.4x10 ⁴	<1.0x10 ⁴	<1.0x10 ⁴	<1.0x10 ⁴	<1.0x10 ³	<1.0x10 ³	<1.0x10 ³
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Listeria spp.</i>	9.2x10 ²	7.8x10 ²	6.9x10 ²	Nd	2.5x10 ³	5.0x10 ¹	5.0x10 ⁰	<1.0x10 ²	5.0x10 ¹
Bolores	4.0x10 ²	4.5x10 ¹	<1.0x10 ²	1.5x10 ⁴	1.0x10 ³	1.0x10 ³	1.7x10 ³	9.1x10 ²	6.8x10 ³
Leveduras	6.7x10 ³	9.6x10 ³	6.7x10 ³	2.3x10 ³	9.5x10 ³	2.7x10 ⁴	3.0x10 ³	1.3x10 ²	5.6x10 ³
<i>Salmonella spp.</i>	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g

Satisfatório/Aceitável/ Não satisfatório Nd- não detetado

Tabela 10- Bactérias do ácido láctico na coalhada

	6M-1	5MA-1	P-1	P-2	6M-2	1M	P-3	6M-3	5MA-2
Microrganismos	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Nutriente agar (Microflora psicrófila)	Ne	Ne	Ne	6.7×10^6	1.6×10^7	3.2×10^7	1.0×10^5	9.1×10^4	1.9×10^5
MRS agar (Mesófilos LAB)	2.9×10^6	1.6×10^6	9.7×10^5	1.6×10^6	4.6×10^6	7.3×10^6	1.2×10^7	4.0×10^6	1.2×10^7
MRS agar (AN) (<i>Mesófilos</i> anaeróbios LAB)	2.0×10^6	1.2×10^6	1.1×10^6	1.8×10^6	2.3×10^6	6.6×10^6	1.2×10^7	2.0×10^6	1.3×10^7
M 17 agar (<i>Streptococcus</i> spp.)	1.9×10^6	2.4×10^6	9.2×10^5	1.8×10^6	5.2×10^6	1.4×10^7	2.8×10^7	8.4×10^6	2.6×10^7
Rogosa agar (<i>Lactobacillus</i> spp.)	2.0×10^6	6.4×10^5	6.3×10^5	8.8×10^5	1.1×10^6	8.8×10^6	2.2×10^7	9.2×10^6	3.1×10^7
AgarMayeux (<i>Leuconostoc</i> spp.)	5.0×10^5	4.0×10^5	3×10^5	8.5×10^5	3.3×10^5	4.7×10^6	2.9×10^6	2.2×10^6	2.3×10^6
Slantz & Bartley agar (<i>Enterococcus</i> spp.)	3.1×10^5	1.2×10^5	3.1×10^5	5.9×10^5	9.2×10^5	2.3×10^6	7.1×10^5	4.0×10^5	6.9×10^5

Ne- não executado

O produto final, o queijo, foi encarado como um produto pronto para consumo pelo que são aplicáveis os critérios do HPA para avaliação da qualidade microbiológica.

Em relação ao parâmetro de *Enterobacteriaceae* na primeira amostra do queijo do produtor P-1 o valor da contagem supera o limite máximo estipulado de $>10^4$ UFC/g, a mesma situação ocorre nas amostras 5MA-1, 6M-1, P-2, 1M, 6M-2 e P-3, onde os valores também foram superiores ao limite sendo assim não satisfatórios como se pode ver na Tabela 11. Já as restantes amostras para este parâmetro enquadram-se no limite do aceitável de 10^2 a $\leq 10^4$ UFC/g, estando estes resultados semelhantes aos obtidos por Tavarina e Malcata (2000) onde os resultados que obtiveram estavam compreendidos entre 10^4 UFC/g e os 10^5 UFC/g e no estudo realizado por Santos (2006) onde o resultado obtido ainda foi superior sendo ele 10^6 UFC/g.

No parâmetro de *Escherichia coli* todas as amostras analisadas superaram o limite máximo de $>10^2$ UFC/g estando assim não satisfatórias (Tabela 11).

Relativamente ao parâmetro de *Bacillus cereus* o limite para um resultado satisfatório é $<10^3$ UFC/g, estando todas as amostras analisadas dentro do limite, assim todas as amostras estão satisfatórias em relação a este parâmetro (Tabela 11).

No parâmetro de *Estafilococos* coagulase positiva o limite para se poder considerar o resultado satisfatório é <20 UFC/g, tendo todas as amostras analisadas cumprido este limite e portanto tem um resultado satisfatório para este parâmetro (Tabela 11).

No parâmetro da *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas foi detetada *Listeria monocytogenes*. Já em relação a *Listeria* spp. foi detetada em quatro das amostras sendo elas a P-1, tendo um resultado não satisfatório pois o limite máximo é de $>10^2$ UFC/g e o resultado obtido superou esse valor, as amostras 5MA-1, a P-2 e a 6M-3 que obtiveram um resultado aceitável pois o limite é de 10 a $\leq 10^2$ UFC/g e estas encontram-se dentro deste limite (Tabela 11).

Nas contagens de bolores e leveduras os valores obtidos neste trabalho (Tabela 11) vão ao encontro dos valores já obtidos em outros estudos como o de

Tavaria e Malcata (2000), onde obteve resultados de 10^4 UFC/g e no estudo realizado por Santos (2006) que obteve resultados 10^5 UFC/g.

No parâmetro de *Salmonella* spp. todas as amostras estão satisfatórias pois não se detetou em nenhuma das amostras (Tabela 11).

Verificando os parâmetros de segurança alimentar para o queijo todas as amostras estão não satisfatórias pois em todas existe no mínimo um parâmetro que excede o limite máximo, neste caso todas as amostras excedem o limite máximo estipulado para *Escherichia coli* e apenas duas das amostras não excedem os limites de *Enterobacteriaceae*.

Tabela 11-Qualidade microbiológica do queijo

	P-1	5MA-1	6M-1	P-2	1M	6M-2	5MA-2	P-3	6M-3
Microrganismos	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.6x10 ⁵	6.7x10 ⁴	2.4x10 ⁵	1.1x10 ⁴	1.1x10 ⁵	1.0x10 ⁵	7.5x10 ³	1.7x10 ⁴	9.0x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	5.6x10 ²	1.3x10 ³	7.6x10 ²	5.1x10 ²	1.3x10 ³	4.9x10 ²	5.1x10 ²	1.8x10 ²	2.6x10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
<i>Estafilococos</i> coagulase positiva	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g
<i>Listeria</i> spp.	6.4x10 ²	9.1x10 ¹	Nd	5.0x10 ¹	Nd	Nd	Nd	Nd	6.0x10 ¹
Bolores	1.4x10 ²	1.5x10 ²	2.0x10 ²	1.0x10 ²	2.0x10 ²	4.0x10 ²	1.2x10 ³	6.8x10 ²	1.0x10 ³
Leveduras	4.6x10 ²	7.7x10 ²	5.9x10 ²	5.5x10 ²	8.2x10 ³	2.3x10 ³	8.5x10 ³	5.2x10 ³	1.2x10 ⁴
<i>Salmonella</i> spp.	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g	Nd/25g

Satisfatório/Limite/ Não satisfatório Nd- não detetado

Tabela 12- Bactérias do ácido láctico do queijo

	P-1	5MA-1	6M-1	P-2	1M	6M-2	5MA-2	P-3	6M-3
Microrganismos	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Nutriente agar (Microflora psicrófila)	6.4×10^5	2.1×10^5	3.9×10^5	Ne	Ne	Ne	1.3×10^6	7.4×10^5	8.8×10^5
MRS agar (Mesófilos LAB)	8.8×10^8	8.5×10^8	5.5×10^8	7.5×10^8	9.0×10^8	7.5×10^8	7.0×10^8	5.9×10^8	8.5×10^8
MRS agar (AN) (Mesófilos anaeróbios LAB)	2.7×10^8	3.5×10^8	4.0×10^8	1.2×10^9	1.6×10^9	8.7×10^8	8.1×10^8	6.7×10^8	9.2×10^8
M 17 agar (<i>Streptococos</i> spp.)	5.2×10^8	6.3×10^7	9.6×10^8	1.7×10^9	2.4×10^9	1.2×10^9	2.6×10^9	1.9×10^9	2.0×10^9
Rogosa agar (<i>Lactobacillus</i> spp.)	2.4×10^8	2.6×10^8	1.8×10^8	1.1×10^9	1.4×10^9	6.6×10^8	1.0×10^9	1.1×10^9	1.3×10^9
AgarMayeux (<i>Leuconostoc</i> spp.)	2.1×10^8	2.9×10^8	2.1×10^8	2.5×10^8	4.2×10^8	3.1×10^8	5.3×10^8	4.4×10^8	6.2×10^8
Slantz & Bartley agar (<i>Enterococcus</i> spp.)	4.8×10^7	3.7×10^7	1.4×10^8	7.2×10^7	7.7×10^7	9.0×10^7	1.7×10^7	1.6×10^7	1.2×10^7

Ne- não executado

Como se pode verificar na Tabela 11 em praticamente todas as amostras de queijo as *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* tem valores elevados, tendo esta situação também sido reportada no estudo de Santos (2006), comparando estes resultados com os resultados obtidos nas matérias-primas para a produção do queijo podemos assumir que para o crescimento de *Enterobacteriaceae*, a presumível fonte destes microrganismos é o cardo utilizado para coalhar o leite devido a que a presença destes microrganismos no cardo já era elevada.

Bactérias do ácido láctico

Em termos de resultados relativos às bactérias do ácido láctico os valores obtidos foram comparados com alguns estudos existentes na área, onde também efetuaram a caracterização microbiana do queijo da Serra da Estrela DOP.

Os resultados obtidos das contagens em Rogosa agar para a presumível contagem de *Lactobacillus* spp. das várias amostras analisadas pode-se observar na Tabela 12 onde as suas contagens se encontram ente 10^8 e 10^9 UFC/g estes valores vão ao encontro do que outros estudos em que se analisou o queijo da Serra da Estrela DOP (Dahl et al., 2000; TAVARIA & MALCATA, 1998; Tavaría, Reis, & Malcata, 2006), tendo o estudo realizado por Santos (2006) obtido valores inferiores em um log.

Nas contagens obtidas em MRS em aerobiose para a presumível contagem de mesófilos os valores das amostras encontram-se em 10^8 UFC/g (Tabela 12). Estes valores vão ao encontro dos valores obtidos em estudos similares realizados ao queijo da Serra da Estrela DOP (Santos, 2006; Tavaría & Malcata, 1998). O mesmo sucede para MRS em anaerobiose onde as contagens se encontram em 10^8 UFC/g coincidindo com os valores apresentados no estudo realizado por Santos (2006).

Nas contagens realizadas no meio SBA, para a presença presuntiva de *Enterococcus* spp. obtivera-se ao longo das amostras valores de 10^7 UFC/g (Tabela 12), estas contagens vão ao encontro dos resultados obtidos em outros estudos (Santos, 2006; Tavaría & Malcata, 2000; Tavaría et al., 2006), sendo que no estudo

realizado por Santos (2006) os valores obtidos neste estudo foram de 10^6 UFC/g estando um log abaixo dos valores aqui obtidos.

Os resultados das contagens em MSE, para a presença presuntiva de *Leuconostoc* spp. que foram obtidas são de 10^8 UFC/g (Tabela 12) em todas as amostras estes valores estão coincidentes com outros estudos que abordaram este tema onde as suas contagens para este tipo de microrganismo também são de 10^8 UFC/g (Dahl et al., 2000; Santos, 2006; Tavaría et al., 2006), mas como já aconteceu com as contagens nos meios SBA e RA no estudo realizado por Santos (2006) os valores obtidos neste estudo foram inferiores na ordem de um log.

Nos resultados referentes as contagens em Nutriente agar (Tabela 12) os resultados obtidos diferem dos obtidos no estudo de Santos (2006) onde as contagens neste estudo se encontram superiores em dois a tres logs aos resultados deste trabalho.

Nas contagens no meio M17 agar, para a presença presuntiva de *Streptococcus* spp., os valores obtidos (Tabela 12) estão de acordo como os valores obtidos por Santos (2006).

Numa visão global a contagem das bactérias do ácido láctico obtidas nos meios utilizados nas amostras analisadas encontram-se dentro dos resultados obtidos nos estudos realizados ao queijo da Serra da Estrela DOP (Tavaría & Malcata, 1998; Dahl et al., 2000; Santos, 2006). Sendo que as contagens obtidas nos meios MRS agar, M17 agar, Rogosa agar e MSE, são semelhantes entre si em cada amostra, os valores obtidos em SBA encontram-se um log abaixo destes, estando as contagens em Nutriente agar inferiores aos restantes meios.

Comparando também a flora de bactérias do ácido láctico das matérias-primas (Tabela 6 e 8) com o produto final (Tabela 12) podemos observar que existe um maior número de bactérias do ácido láctico no produto final isto deve-se a que durante processo produtivo as bactérias do ácido láctico proliferam aumentando assim a sua presença no queijo, devido as reações de proteólise e lipólise presentes neste processo que afetam as bactérias do ácido láctico.

Podemos observar também que os valores das bactérias do ácido láctico mantiveram-se constantes ao longo das amostragens, isto é mesmo com a utilização de diferentes tipos de cardos da região e também com a utilização de amostras de diversas épocas do ano é possível verificar-se que a flora de bactérias lácticas se mantém igual, sendo isto um indicador da possibilidade de se usar a flora de bactérias lácticas do queijo da Serra da Estrela DOP como um marcador de autenticidade e rastreabilidade.

Relativamente a identificação foram realizadas sequenciações às colónias que foram selecionadas, dentro das colónias selecionadas para este processo algumas colónias não foram identificadas devido a que durante o processo de amplificação por PCR não ocorreu a amplificação necessária para que a sequenciação fosse realizada com êxito, sendo assim na seguinte Tabela 13 encontram-se presentes as identificações que foram possíveis de realizar.

Tabela 13 - Identificação por sequenciação das colónias

Momento de amostragem	Amostra	Isolado (T)	Nº da colónia	Meio	Morfologia	Identificação
1	Leite-1 01.49.18.001	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 614bp 99,84%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 788bp 99,87%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 975bp 99,90%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 369 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 670 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 243/190 bp 100%/98,96%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 600 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 609 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 647bp100%

	Coalhada cardo 6M-1 01.49.18.002	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 609bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 600 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 609 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 647bp100%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 26/33 bp 96,30%/100%
	Coalhada cardo 5MA-1 01.49.18.003	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 629bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 623bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 864bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 628bp100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 129bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus citreum</i> 362 bp 100%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 600 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 173 bp 100%
	Coalhada cardo P-1 01.49.18.004	1	2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 257 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 493bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 591bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 580bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 81/44 bp 96,43%/100%
		3	2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus garvieae</i> 629 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i> 980 bp 100%
	Cardo 6M-1 01.49.18.002	2	1	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 672 bp 100%

		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 259 bp 99,62%
Cardo P 01.49.18.015	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 607 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 403 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus curvatus</i> 945 bp 99,58%
	5	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> 609 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> 168 bp 99,41%
Queijo P 01.02.19.005	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 661 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 672 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 671 bp 100%
	2	1	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus</i> sp.
		2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 572 bp 100%
		3	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 498 bp 100%
	3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 388 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 628 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 681 bp 100%
	4	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 383 bp 99,74%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 671 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 665 bp 100%
Queijo 5MA-1 01.02.19.006	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 708 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 572 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 718 bp 100%
	2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 665 bp 100%

2	Queijo 6M-1 01.02.19.007		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 672 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 870 bp 100%
		3	2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 494 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 431/230 bp 100%/100%
		4	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 949 bp 99,79%
		1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 630 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 358/275 bp 100%/100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 639 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 598 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 488 bp 100%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus durans</i> 496 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 79/165 bp 100%/99,40%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 66 bp 100%
		4	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus plantarum</i> 489 bp 99,80%
	Leite-2 01.09.19.007	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus plantarum</i> 597 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 604 bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 813 bp 99,88%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 597 bp 100%
		1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 188 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 685 bp 99,85%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 671 bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
			2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 629 bp 100%
	Coalhada P-2 01.09.19.008	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 188 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 685 bp 99,85%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 671 bp 100%
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
			2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 629 bp 100%
			2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 629 bp 100%

		3	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 694 bp 100%
Coalhada 6M-2 01.09.19.009	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 601 bp 100%
		2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 628 bp 100%
		3	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 496 bp 100%
	2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 670 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 255 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 610 bp 100%
Coalhada 1M 01.09.19.010	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 680 bp 99,85%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
	2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 693 bp 100%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 629 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
Cardo P-2 01.09.19.011	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus gallinarum</i> 541 bp 100%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus</i> sp.
	2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 633 bp 100%
		2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Enterococcus gallinarum</i> 628 bp 99,84%
		3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 675 bp 100%
Cardo 6M-2 01.09.19.012	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus gallinarum</i> 630 bp 99,84%
		2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus gallinarum</i> 610 bp 100%
Cardo 1M 01.09.19.013	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Enterococcus faecium</i> 673 bp 100%
Queijo P-2 01.09.19.014	1	1	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus paracasei</i> 879 bp 100%

			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 610 bp 100%	
			2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 600 bp 100%
				2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 432 bp 100%
				3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 510 bp 100%
	Queijo 1M 01.13.19.007	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 611 bp 100%	
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus plantarum</i> 91bp 100%	
		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 608 bp 100%	
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus curvatus</i> 620 bp 100%	
	Queijo 6M-2 01.13.19.008	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 634 bp 100%	
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 601 bp 100%	
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus plantarum</i> 272 bp 100%	
		2	2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 584 bp 100%	
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 271 bp 99,63%	
	3	Leite-3 01.18.19.019	1	1	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus paracasei</i> 671 bp 100%
			2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 143 bp 100%
3			1	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 207 bp 100%	
			2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 600 bp 100%	
			3	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 665 bp 100%	
Coalhada P-3 01.18.19.020		1	2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 76/82 bp 100%/100%	
		3	3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 340 bp 100%	
Coalhada 6M-3 01.18.19.021		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 604 bp 100%	
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 861 bp 100%	
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 601 bp 100%	
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	
Coalhada 5MA-3 01.18.19.022		1	1	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus casei</i> 637 bp 100%	
			3	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus paracasei</i> 611 bp 100%	

		2	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 633 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus</i> sp
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 590 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.
	Queijo P-3 01.23.19.007	2	1	MRSAan	Bastonete Gram -	<i>Lactobacillus casei</i> 172 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 309 bp 100%
		3	3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 584 bp 100%
	Queijo 6M-3 01.23.19.008	1	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 382 bp 100%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 504 bp 100%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 633 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Leuconostoc citreum</i> 600 bp 100%
	Queijo 5MA-2 01.23.19.009	1	1	MRSAan	Cocos Gram -	<i>Lactobacillus paracasei</i> 591 bp 100%
			3	MRSAan	Cocos Gram -	<i>Lactobacillus paracasei</i> 546 bp 99,82%
		2	1	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus casei</i> 138 bp 100%
			2	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 836 bp 100%
			3	MRSAan	Cocos Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 630 bp 100%
		3	1	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 663 bp 99,7%
			2	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i> 592 bp 100%
			3	MRSAan	Bastonete Gram +	<i>Lactococcus lactis</i> 678 bp 100%

Nas sequenciações realizadas a amostra de leite 1 (L-1) foram identificados *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus faecium*. Sendo que a maioria das colónias identificadas desta amostra são *Leuconostoc mesenteroides*.

Na amostra de leite 2 (L-2) foram identificados *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* sendo que a maioria das colónias foram identificadas como *Lactobacillus paracasei*.

Na última amostra de leite (L-3) foram identificados *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* com maior presença de *Lactobacillus paracasei*.

No que diz respeito às identificações das coalhadas na amostra 6M-1 foram identificados *Enterococcus* spp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* onde a maioria das colónias identificadas foram maioritariamente *Leuconostoc mesenteroides*.

Na amostra de coalhada 6M-2 foram identificados *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis* sendo a maioria das identificações *Leuconostoc mesenteroides*.

Na última amostra da coalhada 6M a 6M-3 as colónias foram identificadas como *Lactobacillus paracasei* e *Cellulosimicrobium* spp., sendo que *Lactobacillus paracasei* aparece em maioria.

Já para as identificações relativas as amostras de coalhada 5MA na 5MA-1 estão presentes *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus citreum* e *Lactococcus lactis*, nesta amostra a maioria das colónias foi identificada como *Lactobacillus paracasei*.

Na amostra 5MA-3 foram identificados *Cellulosimicrobium* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* sendo que a maioria das colónias identificadas como sendo *Lactobacillus paracasei*.

Na amostra de coalhada 1M as colónias foram identificadas como *Enterococcus* sp. e *Leuconostoc mesenteroides* sendo que existe uma maior concentração de *Leuconostoc mesenteroides* relativamente aos *Enterococcus* sp..

No que diz respeito às amostras de cardo começando pela amostra 6M-1 as colónias foram identificadas como *Enterococcus faecium* e na amostra 6M-2 foram identificadas como *Enterococcus gallinarum*.

Nas amostras de cardo proveniente do produtor na amostra P-1 as colónias foram identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, *Cellulosimicrobium funkei* e *Lactobacillus curvatus* sendo que existe uma presença maioritária de *Leuconostoc mesenteroides*.

Na amostra P-2 as colónias foram identificadas como *Enterococcus* sp., *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* e *Leuconostoc mesenteroides* tendo os *Enterococcus* uma maior presença nesta amostra.

Na amostra de cardo 1M a colónia sequenciada foi identificada como *Enterococcus faecium*.

Nas amostras de queijo começando com o queijo da amostra P-1 foram identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus paracasei* e *Lactococcus lactis*, tendo uma presença maioritária de *Lactobacillus paracasei* seguida de *Leuconostoc mesenteroides*.

Na amostra P-2 foram identificados *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei* tendo os *Lactococcus lactis* maior presença, na amostra P-3 foram identificados *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus casei*.

Seguindo para as amostras 5MA na 5MA-1 as colónias foram identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus faecium*, sendo que a grande maioria das colónias foi identificada como *Lactobacillus paracasei*.

Na amostra 5MA-2 foram identificados *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis*, estando como na amostra 5MA-1 os *Lactobacillus paracasei* em grande maioria.

Na amostra de queijo 1M as colónias foram identificadas como *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus*.

Nas amostras 6M começando na amostra 6M-1 as colónias sequenciadas foram identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei*,

Lactobacillus casei, *Enterococcus duram* e *Lactobacillus plantarum*, onde a maioria das colónias foram identificadas como *Lactobacillus paracasei*.

Na amostra 6M-2 foram identificadas como *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*, sendo a maioria *Lactobacillus paracasei*. Na amostra 6M-3 foram identificadas como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc citreum*

4 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível verificar que nas matérias-primas analisadas apenas uma amostra de leite se encontrava satisfatória e uma amostra de cardo se encontrava aceitável e em relação as amostras de queijo todos os queijos testados obtiveram uma classificação não satisfatória. Relacionando os resultados das matérias-primas como os do produto julga-se que presumivelmente o principal responsável pelos resultados não satisfatórios do queijo para o parâmetro da qualidade foi o cardo, isto deve-se principalmente a que os cardos que foram usados, com a exceção do cardo do produtor, a pedido de um parceiro do projeto sendo que o produtor nunca tinha trabalhado com estes cardos nem o processo estava otimizado tecnologicamente para o seu uso e também não existia histórico de análises microbiológicas destes cardos.

Para as análises realizadas a flora de bactérias do ácido láctico verificou-se que sua presença no queijo se manteve constante ao longo do plano de amostragem não tendo sido o crescimento desta flora afetado por diferentes épocas do ano nem pela utilização de cardos distintos.

Nas sequenciações realizadas para a identificação das colónias selecionadas do leite, coalhada, cardo e queijo demonstrou que as bactérias do ácido láctico presentes tanto no leite, na coalhada e no cardo são transferidas para o queijo durante o processo produtivo. Através destas identificações foi possível verificar que a Microbioma de bactérias do ácido láctico do queijo da Serra da Estrela DOP é principalmente composta por *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis* podendo ser usada a presença destas bactérias lácteas como um potencial marcador de autenticidade e rastreabilidade para o queijo da Serra da Estrela DOP, para confirmar estes resultados dever-se-ia efetuar uma comparação com outros queijos de ovelha DOP e não DOP e também de outras regiões, esta comparação não foi realizada durante o período em que este trabalho decorreu.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., . . . Pleadin, J. (2018). Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry*, 246, 6-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>
- Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 200-208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.004>
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Inc, New York*.
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Bolton, E., Little, C., Aird, H., Greenwood, M., McLauchlin, J., Meldrum, R., . . . Grant, K. (2009). *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market*. London: Health Protection Agency.
- Brescia, M. A., Monfreda, M., Buccolieri, A., & Carrino, C. (2005). Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. *Food Chemistry*, 89(1), 139-147. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.016>
- Cawthorn, D.-M., Steinman, H. A., & Witthuhn, R. C. (2012). DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Research International*, 46(1), 30-40. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.011>

- Chapot-Chartier, M.-P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S9-S9. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9
- Christy, A. A., Kasemsumran, S., Du, Y., & Ozaki, Y. (2004). The Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil by Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Analytical Sciences*, 20(6), 935-940. doi:10.2116/analsci.20.935
- Consonni, R., Cagliani, L., Rinaldini, S., & Incerti, A. (2008). Analytical method for authentication of Traditional Balsamic Vinegar of Modena. *Talanta*, 75, 765-769. doi:10.1016/j.talanta.2007.12.005
- Creydt, M., & Fischer, M. (2018). Omics approaches for food authentication. *ELECTROPHORESIS*, 39(13), 1569-1581. doi:doi:10.1002/elps.201800004
- Dahl, S., Tavaría, F. K., & Xavier Malcata, F. (2000). Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal*, 10(4), 255-262. doi:https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00042-X
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026
- DGADR-Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. (2019). Regime de qualidade. Obtido 6 de Abril de 2019, de Produtos tradicionais portugueses website: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/>
- DOP-Vale da estrela. (2019). DOP-Vale da estrela, Queijo da serra da estrela Visto a 09 de 2019, de <http://www.valedaestrela.pt/dop/>
- El Sheikha, A. F., Mokhtar, N. F. K., Amie, C., Lamasudin, D. U., Isa, N. M., & Mustafa, S. (2017). Authentication technologies using DNA-based

- approaches for meats and halal meats determination. *Food Biotechnology*, 31(4), 281-315. doi:10.1080/08905436.2017.1369886
- Engesser, D. M., & Hammes, W. P. (1994). Non-Heme Catalase Activity of Lactic Acid Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(1), 11-19. doi:https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80025-1
- European Communities (2013). Regulation 1151/2012 Official Journal of European Communities, L343/1.
- Feligini, M., Bonizzi, I., Curik, V. C., Parma, P., Greppi, G. F., & Enne, G. (2005). Detection of adulteration in Italian Mozzarella cheese using mitochondrial DNA templates as biomarkers. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 91-95.
- Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2011). Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control*, 22(3), 532-541. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.040
- Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Stefanescu, I., Ionete, R. E., & Bala, C. (2016). Verifying the red wines adulteration through isotopic and chromatographic investigations coupled with multivariate statistic interpretation of the data. *Food Control*, 62, 1-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.003
- Goncalves, M. T. P., Benito, M. J., Cordoba, M. D., Egas, C., Merchan, A. V., Galvan, A. I., & Ruiz-Moyano, S. (2018). Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-throughput Sequencing Analysis. *Journal of Food Science*, 83(5), 1333-1341. doi:10.1111/1750-3841.14141
- Guerreiro, J. S., Fernandes, P., & Bardsley, R. G. (2012). Identification of the species of origin of milk in cheeses by multivariate statistical analysis of

- polymerase chain reaction electrophoretic patterns. *International Dairy Journal*, 25(1), 42-45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.002>
- Hagemann, I. S. (2015). Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In S. Kulkarni & J. Pfeifer (Eds.), *Clinical Genomics* (pp. 3-19). Boston: Academic Press.
- Haynes, E., Jimenez, E., Pardo, M. A., & Helyar, S. J. (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, 101, 134-143. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.010>
- ISO 4833-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique
- ISO 6579-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella —Part 1: Detection of Salmonella spp.
- ISO 6888-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium
- ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination
- ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 °C
- ISO 11290-2 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. —Part 2: Enumeration method

ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidasepositive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide

ISO 21527-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95

ISO 21528-2 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —Part 2: Colony-count technique

Kamimura, B. A., De Filippis, F., Sant'Ana, A. S., & Ercolini, D. (2019). Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, 80, 40-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>

Karoui, R., & De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102(3), 621-640. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>

Li, Z., Li, H., & Bian, K. (2016). Microbiological characterization of traditional dough fermentation starter (Jiaozi) for steamed bread making by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 9-14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.024>

Liu, N., Parra, H. A., Pustjens, A., Hettinga, K., Mongondry, P., & van Ruth, S. M. (2018). Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. *Talanta*, 184, 128-135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.097>

Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., De Filippis, F., Ercolini, D., Cardinali, F., . . . Clementi, F. (2018). Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE.

- International Journal of Food Microbiology*, 286, 66-74.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.022>
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2002). Decreto Regulamentar nº 38/2002 Diário da República n.º 122/2002, Série I-B de 2002-05-27
- Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação (1991). Portaria nº 10/91 Diário da República n.º 2/1991, Série I-B de 1991-01-03
- Miri, A. (2018). Food fraud & quality. *Knowledge for policy - European Commission*, de https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality_en
- Mobfood-projeto (2019). Mobfood Ciência & Tecnologia Agroalimentar. Visto a 09, 2019, de <https://mobfood.pt/>
- Mossel, D., Corry, J., Struijk, C., Baird, R. , (1995). Essentials of the Microbiology of Foods (ed., Vol., pp. 10-30). Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons.
- Pomeranz, Y., & Meloan, C. E. (1994). *Food analysis: theory and practice* (3rd ed ed.). New York: Chapman & Hall.
- Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal – A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34(2), 568-569.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.033>
- Qualifica portugal (2019). Qualifica oriGIn Portugal Retrieved from <https://qualificaportugal.pt/>
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 (2019) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal
- Rocchetti, G., Lucini, L., Gallo, A., Masoero, F., Trevisan, M., & Giuberti, G. (2018). Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses. *Food Research*

International, 113, 407-413.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.029>

- Rubert, J., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2015). Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food--a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(10), 1685-1708. doi:10.1080/19440049.2015.1084539
- Ríos-Reina, R., Elcoroaristizabal, S., Ocaña-González, J. A., García-González, D. L., Amigo, J. M., & Callejón, R. M. (2017). Characterization and authentication of Spanish PDO wine vinegars using multidimensional fluorescence and chemometrics. *Food Chemistry*, 230, 108-116. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.118>
- Sakamoto, M., & Komagata, K. (1996). Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(3), 210-216. doi:[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)88810-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)88810-6)
- Santos, J. (2006). *Molecular Methods for Authentication of Protected Denomination of Origin (PDO) Cheeses*. (PhD). University of Nottingham, Nottingham, UK.
- Santos, J., Fernandes, P., & Bardsley, R. (2015). Authenticity of cheeses concerning differentiation of milk species and recognition of geographical origin by physicochemical analysis. In (pp. 1-22).
- Sentandreu, M. Á., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19-29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.030>
- Silvetti, T., Capra, E., Morandi, S., Cremonesi, P., Decimo, M., Gavazzi, F., . . . Brasca, M. (2017). Microbial population profile during ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter cheese, produced with and without autochthonous starter culture. *Lwt-Food Science and Technology*, 84, 821-831. doi:10.1016/j.lwt.2017.06.022

- Stanley, G. (1998). Cheeses. In *Microbiology of fermented foods* (pp. 263-307): Springer.
- TAVARIA, F. K., & MALCATA, F. X. (1998). Microbiological Characterization of Serra da Estrela Cheese throughout Its Appellation d'Origine Protégée Region. *Journal of Food Protection*, 61(5), 601-607. doi:10.4315/0362-028x-61.5.601
- Tavaria, F. K., & Malcata, F. X. (2000). On the microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiology*, 17(3), 293-304. doi:https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0315
- Tavaria, F. K., Reis, P. J. M., & Malcata, F. X. (2006). Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 895-902. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.08.010
- Temmerman, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 348-359. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007
- Torreblanca-Zanca, A., Aroca-Santos, R., Lastra-Mejías, M., Izquierdo, M., Cancilla, J. C., & Torrecilla, J. S. (2019). Laser diode induced excitation of PDO extra virgin olive oils for cognitive authentication and fraud detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 280, 1-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.014
- Vicol, C., Rapeanu, G., & Bahrim, G. (2009). IDENTIFICATION OF ROMANIAN WINE ADULTERATION FROM VRANCEA COUNTY. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI -- Food Technology*, 3(33), 90-90-94.
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22(5), 222-226. doi:https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.010

- Xiong, X., Yao, L., Ying, X., Lu, L., Guardone, L., Armani, A., . . . Xiong, X. (2018). Multiple fish species identified from China's roasted Xue Yu fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability. *Food Control*, 88, 123-130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.035>
- Yang, Y., Huisman, W., Hettinga, K. A., Liu, N., Heck, J., Schrijver, G. H., . . . van Ruth, S. M. (2019). Fraud vulnerability in the Dutch milk supply chain: Assessments of farmers, processors and retailers. *Food Control*, 95, 308-317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.019>
- Zhang, R. Y., Huo, W. J., Zhu, W. Y., & Mao, S. Y. (2015). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1072-1079. doi:10.1002/jsfa.6800
- Zou, M.-Q., Zhang, X.-F., Qi, X.-H., Ma, H.-L., Dong, Y., Liu, C.-W., . . . Wang, H. (2009). Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6001-6006. doi:10.1021/jf900217s

6 APÊNDICES

6.1 APÊNDICE I – LISTA DE MEIOS E REAGENTES

Tabela 14 -Lista de meios e reagentes

Meios e reagentes	Produtor	Referência do Produtor
Agar Listeria Ottavani & Agosti (ALOA)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84748.0500
Agar Mayeux, Sandine & Elliker (MSE)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK087HA
Água peptonada (APT)	Merck (Darmstadt, Alemanha)	1.07228.0500
Baird Parker agar (BPA)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84664.0500
Bile Aesculin Azide Agar (AAB)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK158HA
Cloranfenicol	Panreac (Barcelona, Espanha)	143481.1606
De Man, Rogosa, Sharpe agar (MRSA)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84607.0500
De Man, Rogosa, Sharpe Broth (MRSB)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84613.0500

Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC)	Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Itália)	610237
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Applichem Panreac (Darmstadt, Alemanha)	A5097.0250
Glucose of medium (GOF)	Laboratorios CONDA (Madrid,Espanha)	21528-1
Lyticas	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA)	L2524-50KU
M 17 agar (M17)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK088HA
Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP)	Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Itália)	610114
Milk plate count agar (MPCA)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84643.0500
Müller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin (MKTTn)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK208HA
Nutrient agar (AN)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK085HA
Peptone sal (PS)	Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Itália)	610038
Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone (RSV)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK 48HA

Rogosa agar (RA)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK033HA
Salmonella Detection and Identification agar (SMID)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK194HA
Slanetz–Bartley agar (SBA)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK037HA
Tiras de oxidase	Merck (Darmstadt, Alemanha)	100181
Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	28808.294
Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84637.0500
Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	84636.0500
Violet Red Bile Glucose (VRBG)	VWR Chemicals (Radnor, Pensilvânia, EUA)	95022.026
Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)	Biokar Diagnostics (Allonne, França)	BK168HA

6.2 APÊNDICE II – LISTA DE EQUIPAMENTOS

Tabela 15 - Lista de equipamentos

Equipamento	Modelo	Marca
Arca Frigorífica -80°C	MDF-U55V	Panasonic
Autoclave	MLS-3751L	Panasonic
Balança	6200DSCS	Precisa
Balança de precisão	GP3202-OCE	Sartorius
Balança de precisão (1-0,001g)	PG 503	Mettler Toledo
Banho-Maria	1083	GFL
Banho-Maria	WB22	Memmert
Banho-Maria com circulação	OBN28	Hetto
Câmara de Segurança Biológica tipo II	HERAsafe KS12	Heraeus
Contador de colónias	Colony counter DigitalS	Comecta
Estufa de incubação	BD115	WTBinder
Estufa de incubação	MIR262	Sanyo
Estufa de incubação	Incucenter IC80	Salvis
Estufa de incubação	MIR262	Sanyo
Estufa de incubação refrigerada	MIR153	Sanyo
Estufa de incubação refrigerada	MIR153	Panasonic
Homogenizador / mastigador	Lab-blender 400	Stomacher

Incubadora orbital	S 886072/6	CERTOMAT BBraun
Placa de aquecimento c/ agitação	Ceramic Top SM22	Stuart Scientific
Potenciômetro de Bancada	Orion 4 Star	Thermo Scientific Orion
Sistema de distribuição de culturas	Perimatic GPII SV 3.4	Jencons
Vortex	Autovortex SA2	Stuart Scientific

